

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. November 2001 (15.11.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/86299 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543 (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/04545

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. April 2001 (23.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 21 674.9 5. Mai 2000 (05.05.2000) DE  
101 06 643.0 12. Februar 2001 (12.02.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); 51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOHEISEL, Werner [DE/DE]; Gerstenkamp 19, 51061 Köln (DE). PETRY, Christoph [DE/DE]; Doerperhofstr. 16, 47800 Krefeld (DE). HAASE, Markus [DE/DE]; Klaus-Nanne-Str. 60, 22457 Hamburg (DE). RIWOTZKI, Karsten [DE/DE]; Schellingstr. 77, 22089 Hamburg (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Titel: DOPED NANOPARTICLES AS BIOLABELS

(54) Bezeichnung: DOTIERTE NANOTEILCHEN ALS BIOLABEL

(57) Abstract: The invention relates to a simple detection probe containing luminescent inorganic doped nanoparticles (i.i.d nanoparticles) which can be detected after excitation by a source of radiation by their absorption and/or scattering and/or diffraction of the excitation radiation or by emission of fluorescent light, and whose surface is prepared in such a way that affinity molecules for detecting a biological or other organic substance can couple with this prepared surface.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist eine einfache Nachweissonde enthaltend lumineszierende anorganische dotierte Nanoteilchen (i.d.Nanoteilchen), die nach Anregung mit einer Strahlungsquelle durch Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung der Anregungsstrahlung oder durch Emission von Fluoreszenzlicht nachweisbar sind und deren Oberfläche so präpariert ist, dass Affinitätsmoleküle zum Nachweis einer biologischen oder sonstigen organischen Substanz an diese präparierte Oberfläche anköpfeln können.

WO 01/86299 A2

**Dotierte Nanoteilchen als Biolabel**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nachweissonde für biologische Anwendungen, die lumineszierende anorganische dotierte Nanoteilchen (Iad-Nanoteilchen) ent-  
hält.

10 Der Einsatz von Markern in biologischen Systemen zur Kennzeichnung oder Verfol-  
gung spezifischer Substanzen ist seit Jahrzehnten ein etabliertes Instrument in der  
medizinischen Diagnostik und biotechnologischen Forschung. Solche Marker finden  
insbesondere Anwendung in der Flow Cytometrie, Histologie, in Immunoassays oder  
in der Fluoreszenz-Mikroskopie, bei letzterer zur Untersuchung biologischer und  
nicht-biologischer Materialien.

15 Die in der Biologie und Biochemie gängigsten Markersysteme sind radioaktive Iso-  
tope von Jod, Phosphor und anderen Elementen sowie Enzyme wie Meerrettich  
Peroxidase oder Alkalische Phosphatase, für deren Detektion spezielle Substrate be-  
nötigt werden. Außerdem werden als Marker zunehmend fluoreszierende organische  
Farbstoffmoleküle verwendet wie Fluorescein, Texas Red oder Cy5, die selektiv an  
20 eine bestimmte biologische oder andere organische Substanz angebunden sind. Je  
nach verwendetem System ist meistens ein weiteres Verbindungsmolekül oder eine  
Kombination von weiteren Verbindungsmolekülen oder Affinitätsmolekülen zwi-  
schen der nachzuweisenden Substanz und dem Marker notwendig, die die erforder-  
liche spezifische Affinität zur eindeutigen Erkennung der nachzuweisenden Substanz  
25 aufweist. Die hierfür erforderliche Technik ist bekannt und z. B. beschrieben in  
„Bioconjugate Techniques“, G.T. Hermanson, Academic Press, 1996 oder in  
„Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. A Practical Guide to  
Technology for Quantitative Real-Time Analysis“, Second Edition, W.T. Mason, ed.,  
Academic Press, 1999. Nach externer, meist elektromagnetischer Anregung des Mar-  
30 kers wird dieser dann durch Emission von Fluoreszenzlicht die Präsenz der an den  
Marker angebundenen biologischen oder anderen organischen Substanzen anzeigen.

Nachteilig an den fluoreszierenden organischen Farbstoffmolekülen, die den heutigen Stand der Technik repräsentieren, ist, dass sie insbesondere bei Anwesenheit von Sauerstoff oder Radikalen zum Teil bereits nach einigen Millionen Lichtabsorptions- 5 /Lichtemissionszyklen irreversibel geschädigt oder zerstört werden. Sie weisen also häufig eine für viele Anwendungen ungenügende Stabilität gegenüber einfallendem Licht auf. Weiterhin können die fluoreszierenden organischen Farbstoffmoleküle auch phototoxisch auf die biologische Umgebung wirken.

10 Ein weiterer Nachteil der fluoreszierenden, organischen Farbstoffe sind deren breite Emissionsbanden, die häufig einen zusätzlichen Ausläufer auf der langwelligen Seite des Fluoreszenzspektrums aufweisen. Dadurch wird ein „Multiplexing“, das heißt die gleichzeitige Identifizierung mehrerer Substanzen, die mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, wegen der dann teilweise überlappenden Emissionsbanden behindert und die Anzahl der parallel nachweisbaren unterschiedlichen Substanzen stark begrenzt. Ein weiterer Nachteil bei der gleichzeitigen Verwendung mehrerer organischer Fluoreszenzfarbstoffe sind die relativ schmalen spektralen Anregungsbanden, innerhalb denen eine Anregung des Farbstoffs möglich ist. Um alle Farbstoffe effizient anregen zu können, müssen deshalb mehrere Lichtquellen, 15 im allgemeinen Laser, oder ein komplizierter optischer Aufbau unter Verwendung einer Weißlichtquelle und einer geeigneten Anordnung von Farbfiltern verwendet werden.

20 Als alternative Marker zu den fluoreszierenden, organischen Farbstoffen wurden fluoreszierende anorganische Halbleiter-Nanokristalle vorgeschlagen. In der Patentschrift US 5,990,479 sowie in den PCT-Anmeldungen WO 00/17642 und WO 00/29617 wird offenbart, dass fluoreszierende anorganische Halbleiter-Nanokristalle, die der Klasse der II-VI- oder der III-V-Verbindungshalbleiter angehören und unter bestimmten Voraussetzungen auch aus Elementen der 4. Hauptgruppe des Periodensystems bestehen, als Fluoreszenzmarker in biologischen Systemen verwendet 25 werden können. Durch Variation der Größe der Halbleiter-Nanokristalle kann durch 30

Ausnutzung des so genannten „Quantum Size Effect“ die Emissionswellenlänge des Fluoreszenzlichtes der Halbleiter-Nanokristalle im Spektralbereich des sichtbaren Lichts und des nahen Infrarot eingestellt werden. Die genaue Lage der Emissionswellenlänge hängt von der Festkörper-Bandlücke zwischen Leitungsband und Valenzband des gewählten Halbleitermaterials ab und wird durch die Teilchengröße bzw. durch deren Verteilung bestimmt. Halbleiter-Nanokristalle und ihre Verwendung als biologische Marker ist weiterhin offenbart in Warren C. W. Chan and Shuming Nie, Science, Vol. 281, 1998, Seiten 2016-2018 und Marcel Bruchez Jr., Mario Moronne, Peter Gin, Shimon Weiss, A. Paul Alivisatos, Science, Vol. 281, 10 Seiten 2013-2016.

Die Halbleiter-Nanokristalle haben den Nachteil, dass sie mit höchster Präzision hergestellt werden müssen und somit nicht leicht zu produzieren sind. Da die Emissionswellenlänge des Fluoreszenzlichts von der Größe der Halbleiter-Nanokristalle abhängt, ist für eine schmale Bandbreite des Fluoreszenzlichts, das sich aus der Fluoreszenzlichtemission von einer Vielzahl einzelner Halbleiter-Nanokristallen zusammensetzt, erforderlich, dass die Größenverteilung der Halbleiter-Nanokristalle sehr eng ist. Um die für das Multiplexing erforderliche schmale Bandbreite des Fluoreszenzlichts zu gewährleisten, dürfen die Größenunterschiede zwischen den einzelnen Halbleiter-Nanokristallen nur wenige Angström, das heißt nur wenige Monolagen betragen. Dies stellt hohe Anforderungen an die Synthese der Halbleiter-Nanokristalle. Bei den Halbleiter-Nanokristallen wurden außerdem relativ schwache Quantenausbeuten bedingt durch strahlungslose Elektron-Loch-Paar Rekombinationen auf der Oberfläche der Halbleiter-Nanokristalle beobachtet. Aus diesem Grund wurde eine aufwändige Kern-Hüllen-Struktur vorgeschlagen, wobei der Kern aus dem eigentlichen Halbleitermaterial und die Hülle aus einem weiteren Halbleitermaterial mit einer größeren Bandlücke (z. B. CdS oder ZnS) besteht, das auf dem Kern so weit es möglich ist epitaktisch aufwächst. Um eine Anbindung dieser Kern-Hüllen-Teilchen an das nachzuweisende biologische Material zu erreichen, wurde zusätzlich noch eine weitere dünne Hülle aufgebracht, die vorzugsweise aus Silicaglas ( $\text{SiO}_x$ ,  $x = 1-2$ ) besteht (US 5,990,479, WO 99/21934, EP 1034234, Peng et al., 25 30

Journal of the American Chemical Society, Vol. 119, 1997, Seiten 7019 – 7029). Eine solche multiple Kern-Hüllen-Struktur beinhaltet weitere relativ aufwändige Syntheseschritte. Nachteilig ist weiterhin, dass die Mehrzahl der aus der Literatur bekannten und fast alle bisher praktisch verwendeten Halbleiter-Nanokristalle Elemente 5 enthalten, die als toxisch einzustufen sind wie z. B. Cadmium, Selen, Tellur, Indium, Arsen, Gallium oder Quecksilber.

Weiterhin können zum Nachweis spezieller biologischer Substanzen Kolloide aus 10 Edelmetallen wie Gold oder Silber als Sonden eingesetzt werden. Die Oberflächen dieser Kolloide sind so modifiziert, dass eine Konjugation mit Biomolekülen möglich ist. Der Nachweis der Kolloide erfolgt über Messung der Lichtabsorption bzw. des elastisch gestreuten Lichts nach Einstrahlung von weißem Licht. Durch Anregung der Oberflächenplasmaresonanz der Metallteilchen, deren Wellenlänge spezifisch für das Material und für die Teilchengröße ist, kann so eine bestimmte Klasse 15 von Teilchen und somit auch die entsprechenden Konjugate spezifisch erkannt werden (S. Schultz, D. R. Smith, J. J. Mock, D. A. Schultz; Proceedings of the National Academy of Science, Vol. 97, Issue 3, February 1, 2000, Seiten 996 – 1001). Durch den hohen Absorptions- und Streuquerschnitt ist der Nachweis sehr empfindlich. Nachteilig an dieser Lösung ist allerdings die relativ geringe Auswahl 20 an verfügbaren Arbeitswellenlängen, so dass ein echtes Multiplexing nur eingeschränkt möglich ist. Außerdem ist die Effizienz, Licht zu streuen sehr stark vom Material und von der Teilchengröße abhängig, so dass die Nachweisempfindlichkeit eines nachzuweisenden Biomoleküls vom Material aber in hohem Maße von der 25 Größe und somit von der Streufarbe des als Reporter wirkenden Metallteilchen abhängt.

In den Patentschriften US 4,637,988 und US 5,891,656 wird offenbart, dass Metall-Chelate mit einem Metallion aus der Reihe der Lanthaniden als Fluoreszenzmarker 30 verwendet werden kann. Vorteilhaft an diesem System ist, dass die durch Lichtabsorption angeregten Zustände eine hohe Lebensdauer aufweisen, die bis in den Millisekundenbereich reichen. Dadurch kann der Nachweis der Reporterfluoreszenz zeit-

aufgelöst erfolgen, so dass Autofluoreszenzlicht nahezu vollständig unterdrückt werden kann. Allerdings haben diese Chelat-Systeme oft den Nachteil, dass deren Lumineszenz in wässrigen Medien, die für die meisten biologischen Anwendungen vorausgesetzt werden, in einem hohen Maße gelöscht wird. Deshalb müssen Chelate 5 oft in einem zusätzlichen Schritt von der eigentlich nachzuweisenden Substanz separiert und in eine wasserfreie Umgebung gebracht werden (I.Hemmilä, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 48, 1988, Seiten 389 – 400). Immunohistochemische Untersuchungen sind somit allerdings nicht möglich, da durch den Separationsschritt die Ortsinformation der Markierung verloren geht.

10

In den Patentschriften US 4,283,382 und US 4,259,313 wird offenbart, dass Polymer-(Latex-) Teilchen, in denen Metall-Chelate mit einem Metallion aus der Reihe der Lanthaniden eingebettet sind, ebenfalls als Fluoreszenzmarker verwendet werden können.

15

Leuchtporphore, wie sie seit langer Zeit als Beschichtungsmaterial in Fluoreszenzlampen oder in Kathodenstrahlröhren verwendet werden, wurden ebenfalls als Reporterteilchen in biologischen Systemen verwendet. In US 5,043,265 wird offenbart, dass biologische Makromoleküle, die an Leuchtporphorteilchen gekoppelt sind 20 durch Messung der Fluoreszenz nachgewiesen werden können. Es wird ausgeführt, dass die Größe der Phosphorteilchen kleiner als 5  $\mu\text{m}$ , bevorzugt kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sein sollte. Es wird allerdings auch erklärt, dass die Fluoreszenz der Teilchen mit kleiner werdendem Durchmesser rasch an Intensität verliert und die Teilchen deshalb größer als 20 nm und bevorzugt sogar größer als 100 nm sein sollten. Der Grund 25 hierfür liegt offenbar u. a. in der Herstellungsmethode der Teilchen. Ausgehend von kommerziell erhältlichen Leuchtporphoren mit einer Größe um 5  $\mu\text{m}$  werden diese in einer Kugelmühle auf eine Größe von unter 1  $\mu\text{m}$  herunter gemahlen. Nachteilig hieran ist, dass man durch diese Prozedur eine breite Größenverteilung der Teilchen und einen im allgemeinen relativ hohen Agglomerationsgrad erhält. Außerdem 30 werden wahrscheinlich in die Kristallstruktur der Teilchen eine hohe Zahl von Defekten eingetragen, die die Quanteneffizienz der Fluoreszenzstrahlung erheblich

verringern kann. Nachteilig ist weiterhin, dass sich die in der Erfindung offenbarten Teilchen mit einer Größe von meist mehreren 100 Nanometern und einer breiten Größenverteilung vielen Anwendungen, in der die Masse und Größe des Markers eine Rolle spielt, wie dies z. B. bei Anfärbungen von Zellbestandteilen oder beim 5 Verfolgen von Substanzen der Fall ist, verschließen.

Spezielle Herstellungsverfahren von bestimmten Leuchtphosphoren mit Größen zwischen 1 nm und 100 nm, die auch für biologische Anwendungen nützlich sein sollen, werden in US 5,893,999 beansprucht. Darin wird ausgeführt, dass die Teilchen durch Gasphasensynthesen (Verdampfung und Kondensation, RF thermischer Plasma Prozess, Plasmaspritzen, Sputtern) und durch Hydrothermalsynthesen hergestellt werden können. Nachteilig an diesen Teilchen insbesondere für Anwendungen im Bereich der Biologie und Biochemie ist der hohe Agglomerationsgrad der Primärteilchen und somit zu die große Gesamtgröße der praktisch verwendbaren Agglomerate sowie die sehr breite Größenverteilung der verwendeten Teilchen, was die beschriebenen Herstellungsprozesse inherent mit sich bringen. Sowohl der Agglomerationsgrad als auch die breite Größenverteilung sind in zudem anhand der in der Patentschrift enthaltenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich sichtbar.

20 Für den Einsatz als biologische Label werden spezielle Typen von Leuchtphosphoren in US 5,674,698 offenbart. Es handelt sich dabei um „Aufkonvertierende Phosphore“ (upconverting phosphors), die die Eigenschaft haben, über einen Zwei-Photonen-Prozess Licht zu emittieren, das eine kleinere Wellenlänge besitzt als das absorbierte Licht. Durch Verwendung dieser Teilchen kann quasi hintergrundfrei gearbeitet 25 werden, da solche Autofluoreszenz weitestgehend unterdrückt ist. Die Teilchen werden durch Mahlung und anschließender Temperung hergestellt. Die Teilchengröße liegt zwischen 10 nm und 3 µm, bevorzugt zwischen 300 nm und 1 µm. Nachteilig ist hier wieder die große Teilchengröße und die durch den Herstellungsprozess bedingten breiten Größenverteilung.

Eine Herstellungsmethode für diese „aufkonvertierenden“ Leuchtporphore, die ohne Mahlung auskommt, wird in US 5,891,361 und in US 6,039,894 offenbart. Es handelt sich hier um Fällungsprodukte, die durch nachträgliche teilweise reaktive Hochtemperaturbehandlungen in der Gasphase zu fluoreszierenden Phosphoren mit Größen zwischen 100 nm und 1  $\mu$ m umgewandelt werden. Auch hier liegen die Nachteile wieder in den großen Teilchengrößen und in der breiten Größenverteilung, was mit den hohen Temperaturen bei der Synthese einhergeht.

In wissenschaftlichen Publikationen werden die Herstellung und Untersuchungen von Lumineszenzeigenschaften von ausgewählten lumineszierenden anorganischen dotierten Nanoteilchen behandelt. Die publizierten lumineszierenden anorganischen dotierten Nanoteilchen bestehen aus Oxiden, Sulfiden, Phosphaten oder Vanadaten, die mit Lanthaniden oder aber mit Mn, Al, Ag oder Cu dotiert sind. Diese lumineszierenden anorganischen dotierten Nanoteilchen fluoreszieren auf Grund ihrer Dotierung in einem engen Spektralbereich. Ein Anwendungspotential wird im Einsatz als Phosphore in Kathodenstrahlröhren oder als Lampenleuchtstoffe gesehen. Unter anderem ist die Herstellung der folgenden lumineszierenden anorganischen dotierten Nanoteilchen publiziert worden: YVO<sub>4</sub>:Eu, YVO<sub>4</sub>:Sm, YVO<sub>4</sub>:Dy (K. Riwotzki, M. Haase; Journal of Physical Chemistry B; Vol. 102, 1998, Seiten 10129 bis 10135); LaPO<sub>4</sub>:Eu, LaPO<sub>4</sub>:Ce, LaPO<sub>4</sub>:Ce,Tb; (H. Meyssamy, K. Riwotzki, A. Kornowski, S. Naused, M. Haase; Advanced Materials, Vol. 11, Issue 10, 1999, Seiten 840 bis 844); (K. Riwotzki, H. Meyssamy, A. Kornowski, M. Haase; Journal of Physical Chemistry B Vol. 104, 2000, Seiten 2824 bis 2828); ZnS:Tb, ZnS:TbF<sub>3</sub>, ZnS:Eu, ZnS:EuF<sub>3</sub>, (M. Ihara, T. Igarashi, T. Kusunoki, K. Ohno; Society for Information Display, Proceedings 1999, Session 49.3); Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu (Q. Li, L. Gao, D. S. Yan; Nanostructured Materials Vol. 8, 1999, Seiten 825 ff); Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>:Eu (M. Yin, W. Zhang, S. Xia, J. C. Krupa; Journal of Luminescence, Vol. 68, 1996, Seiten 335 ff.); SiO<sub>2</sub>:Dy, SiO<sub>2</sub>:Al, (Y. H. Li, C. M. Mo, L. D. Zhang, R. C. Liu, Y. S. Liu; Nanostructured Materials Vol. 11, Issue 3, 1999, Seiten 307 bis 310); Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Tb (Y. L. Soo, S. W. Huang, Z. H. Ming, Y. H. Kao, G. C. Smith, E. Goldburt, R. Hodel, B. Kulkarni, J. V. D. Veliadis, R. N. Bhargava; Journal of Applied Physics Vol. 83,

Issue 10, 1998, Seiten 5404 bis 5409); CdS:Mn (R. N. Bhargava, D. Gallagher, X. Hong, A. Nurmikko; Physical Review Letters Vol. 72, 1994, Seiten 416 bis 419); ZnS:Tb (R. N. Bhargava, D. Gallagher, T. Welker; Journal of Luminescence, Vol. 60, 1994, Seiten 275 ff.).

5

Einen Überblick über die bekannten lumineszierenden anorganischen dotierten Materialien und ihre Verwendung als technische Phosphore, die eine Größe von einigen Mikrometern haben, gibt Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, WILEY-VCH, 6<sup>th</sup> edition, 1999, Electronic Release, Kapitel „Luminescent Materials: 1. Inorganic Phosphors“. Die dort gegebene Übersicht bezieht sich ausschließlich auf die für die dort beschriebenen Anwendungen verwendbaren Materialklassen und nicht auf besondere Eigenschaften dieser Materialien in Form von Nanoteilchen.

10

Die erfindungsgemäße Aufgabe besteht in der Bereitstellung einer Nachweissonde für biologische Anwendungen, die wenige Nanometer große, anorganische, lumineszierende Teilchen enthält und nicht die oben beschriebenen Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Marker aufweist.

15

Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe besteht in einer Nachweissonde für biologische Anwendungen enthaltend lumineszierende anorganische dotierte Nano-teilchen (lad-Nanoteilchen).

20

lad-Nanoteilchen sind mit Fremdionen derart dotiert, dass sie nach Anregung mit einer Strahlungsquelle durch Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung dieser Strahlung oder durch Emission von Fluoreszenzlicht materialspezifisch nachgewiesen werden können. Die lad-Nanoteilchen können durch schmal- oder breitbandige elektromagnetische Strahlung oder durch einen Teilchenstrahl angeregt werden. Der qualitative und/oder quantitative Nachweis der Teilchen erfolgt durch Messung einer Änderung der Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung dieser Strahlung oder durch Messung von materialspezifischem Fluoreszenzlicht bzw. dessen Änderung.

25

30

Die lad-Nanoteilchen haben eine nahezu sphärische Morphologie mit Ausdehnungen im Bereich von 1 nm bis 1  $\mu$ m, bevorzugt im Bereich von 2 nm bis 100 nm, besonders bevorzugt im Bereich von 2 nm bis unter 20 nm und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 nm und 10 nm. Unter Ausdehnungen wird der maximale Abstand von zwei auf der Oberfläche eines lad-Teilchens liegenden Punkte verstanden. Die lad-Nanoteilchen können auch eine ellipsoidförmige Morphologie besitzen oder facettiert sein mit Ausdehnungen, die in den oben angegebenen Grenzen liegen. Die lad-Nanoteilchen können darüber hinaus auch eine ausgeprägte nadelförmige Morphologie aufweisen mit einer Breite von 3 nm bis 50 nm, bevorzugt von 3 nm bis unter 20 nm und einer Länge von 20 nm bis 5  $\mu$ m, bevorzugt von 20 nm bis 500 nm. Die Teilchengröße kann mit der Methode der Ultrazentrifugation, der Gelpermeationschromatographie oder mittels Elektronenmikroskopie bestimmt werden.

15 Im Sinne der Erfindung geeignete Materialien für die lad-Nanoteilchen sind anorganische Nanokristalle, deren Kristallgitter (Wirtsmaterial) mit Fremdionen dotiert ist. Hierunter zählen insbesondere alle Materialien und Materialklassen, die als sogenannte Phosphore z. B. in Leuchtschirmen (z. B. für Elektronenstrahlröhren) oder als Beschichtungsmaterial in Fluoreszenzlampen (für Gasentladungslampen) Verwendung finden, wie sie zum Beispiel in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, WILEY-VCH, 6<sup>th</sup> edition, 1999 Electronic Release, Kapitel „Luminescent Materials: 1. Inorganic Phosphors“ genannt sind, sowie die aus dem oben zitierten Stand der Technik bekannten lumineszierenden anorganischen dotierten Nanoteilchen. In diesen Materialien dienen die Fremdionen als Aktivatoren für die Emission von Fluoreszenzlicht nach Anregung durch UV-, sichtbares oder IR-Licht, Röntgen- oder Gammastrahlen oder Elektronenstrahlen. Bei einigen Materialien werden auch mehrere Sorten von Fremdionen in das Wirtsgitter eingebaut, um einerseits Aktivatoren für die Emission zu erzeugen und um andererseits die Anregung des Teilchensystems effizienter zu gestalten oder um die Absorptionswellenlänge durch Verschiebung an die Wellenlänge einer gegebenen Anregungslichtquelle anzupassen (sogenannte Sensitizer). Der Einbau mehrerer Sorten von

20

25

30

Fremdionen kann auch dazu dienen, gezielt eine bestimmte Kombination von Fluoreszenzbanden, die von einem Teilchen emittiert werden sollen, einzustellen.

Das Wirtsmaterial der lad-Nanoteilchen besteht vorzugsweise aus Verbindungen des Typs XY. Dabei ist X ein Kation aus Elementen der Hauptgruppen 1a, 2a, 3a, 4a der Nebengruppen 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b oder der Lanthaniden des Periodensystems. In einigen Fällen kann X auch eine Kombination bzw. Mischung aus den genannten Elementen sein. Y kann ein mehratomiges Anion, enthaltend ein oder mehrere Element(e) der Hauptgruppen 3a, 4a, 5a, der Nebengruppen 3b, 4b, 5b, 6b, 7b und/oder 8b sowie Elemente der Hauptgruppen 6a und/oder 7a, sein. Y kann aber auch ein einatomiges Anion aus der Hauptgruppe 5a, 6a oder 7a des Periodensystems sein. Das Wirtsmaterial der lad-Nanoteilchen kann auch aus einem Element der Hauptgruppe 4a des Periodensystems bestehen. Als Dotierung können Elemente der Hauptgruppen 1a, 2a oder aus der Gruppe enthaltend Al, Cr, Tl, Mn, Ag, Cu, As, Nb, Nd, Ni, Ti, In, Sb, Ga, Si, Pb, Bi, Zn, Co und/oder Elemente der Lanthaniden dienen. Auch Kombinationen von zwei oder mehreren dieser Elemente können in unterschiedlichen relativen Konzentrationen zueinander als Dotierungsmaterial dienen. Die Konzentration des Dotierungsmaterials im Wirtsgitter beträgt zwischen  $10^{-5}$  mol% und 50 mol%, bevorzugt zwischen 0,01 mol% und 30 mol%, besonders bevorzugt zwischen 0,1 mol% und 20 mol%.

Bevorzugt werden Sulfide, Selenide, Sulfoselenide, Oxysulfide, Borate, Aluminate, Gallate, Silikate, Germanate, Phosphate, Halophosphate, Oxide, Arsenate, Vanadate, Niobate, Tantalate, Sulfate, Wolframate, Molybdate, Alkalihalogenide sowie andere Halogenide oder Nitride als Wirtsmaterialien für die lad-Nanoteilchen verwendet. Beispiele für diese Materialklassen sind zusammen mit den entsprechenden Dotierungen in der folgenden Liste angegeben (Materialien des Typs B:A mit B = Wirtsmaterial und A = Dotierungsmaterial):

LiI:Eu; NaI:Tl; CsI:Tl; CsI:Na; LiF:Mg; LiF:Mg,Ti; LiF:Mg,Na; KMgF<sub>3</sub>:Mn;  
Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu; BaFCl:Eu; BaFCl:Sm; BaFBr:Eu; BaFCl<sub>0,5</sub>Br<sub>0,5</sub>:Sm; BaY<sub>2</sub>F<sub>8</sub>:A (A = Pr,  
Tm, Er, Ce); BaSi<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:Pb; BaMg<sub>2</sub>Al<sub>16</sub>O<sub>27</sub>:Eu; BaMgAl<sub>14</sub>O<sub>23</sub>:Eu;

BaMgAl<sub>10</sub>O<sub>17</sub>:Eu; BaMgAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu; Ba<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Ti; (Ba,Zn,Mg)<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Pb;  
 Ce(Mg,Ba)Al<sub>11</sub>O<sub>19</sub>; Ce<sub>0,65</sub>Tb<sub>0,35</sub>MgAl<sub>11</sub>O<sub>19</sub>:Ce,Tb; MgAl<sub>11</sub>O<sub>19</sub>:Ce,Tb;  
 MgF<sub>2</sub>:Mn; MgS:Eu; MgS:Ce; MgS:Sm; MgS:(Sm,Ce); (Mg,Ca)S:Eu; MgSiO<sub>3</sub>:Mn;  
 3,5MgO-0,5MgF<sub>2</sub>-GeO<sub>2</sub>:Mn; MgWO<sub>4</sub>:Sm; MgWO<sub>4</sub>:Pb; 6MgO-As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:Mn;  
 5 (Zn,Mg)F<sub>2</sub>:Mn; (Zn<sub>4</sub>Be)SO<sub>4</sub>:Mn; Zn<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>:Mn; Zn<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>:Mn,As; ZnO:Zn;  
 ZnO:Zn,Si,Ga; Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:Mn; ZnS:A (A = Ag, Al, Cu); (Zn,Cd)S:A (A = Cu, Al,  
 Ag, Ni); CdBO<sub>4</sub>:Mn; CaF<sub>2</sub>:Mn; CaF<sub>2</sub>:Dy; CaS:A (A = Lanthanide, Bi); (Ca,Sr)S:Bi;  
 CaWO<sub>4</sub>:Pb; CaWO<sub>4</sub>:Sm; CaSO<sub>4</sub>:A (A = Mn, Lanthanide);  
 10 3Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·Ca(F,Cl)<sub>2</sub>:Sb,Mn; CaSiO<sub>3</sub>:Mn,Pb; Ca<sub>2</sub>Al<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Ce; (Ca,Mg)SiO<sub>3</sub>:Ce;  
 (Ca,Mg)SiO<sub>3</sub>:Ti; 2SrO·6(B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)·SrF<sub>2</sub>:Eu; 3Sr<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·CaCl<sub>2</sub>:Eu; A<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·ACl<sub>2</sub>:Eu  
 (A = Sr, Ca, Ba); (Sr,Mg)<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Eu; (Sr,Mg)<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:Sn; SrS:Ce; SrS:Sm,Ce;  
 SrS:Sm; SrS:Eu; SrS:Eu,Sm; SrS:Cu,Ag; Sr<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Sn; Sr<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Eu;  
 Sr<sub>4</sub>Al<sub>14</sub>O<sub>25</sub>:Eu; SrGa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>:A (A = Lanthanide, Pb); SrGa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>:Pb;  
 15 Sr<sub>3</sub>Gd<sub>2</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>18</sub>:Pb,Mn; YF<sub>3</sub>:Yb,Er; YF<sub>3</sub>:Ln (Ln = Lanthanide); YLiF<sub>4</sub>:Ln (Ln = Lan-  
 thanide); Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>:Ln (Ln = Lanthanide); YAl<sub>3</sub>(BO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>:Nd,Yb; (Y,Ga)BO<sub>3</sub>:Eu;  
 (Y,Gd)BO<sub>3</sub>:Eu; Y<sub>2</sub>Al<sub>3</sub>Ga<sub>2</sub>O<sub>12</sub>:Tb; Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>:Ln (Ln = Lanthanide); Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Ln (Ln = Lan-  
 thanide); Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Ln (Ln = Lanthanide); YVO<sub>4</sub>:A (A = Lanthanide, In);  
 Y(P,V)O<sub>4</sub>:Eu; YTaO<sub>4</sub>:Nb; YAlO<sub>3</sub>:A (A = Pr, Tm, Er, Ce); YOCl:Yb,Er;  
 20 LnPO<sub>4</sub>:Ce,Tb (Ln = Lanthanide oder Mischungen von Lanthaniden); LuVO<sub>4</sub>:Eu;  
 GdVO<sub>4</sub>:Eu; Gd<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Tb; GdMgB<sub>5</sub>O<sub>10</sub>:Ce,Tb; LaOBr:Tb; La<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Tb; LaF<sub>3</sub>:Nd,Ce;  
 BaYb<sub>2</sub>F<sub>8</sub>:Eu; NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er; NaGdF<sub>4</sub>:Yb,Er; NaLaF<sub>4</sub>:Yb,Er; LaF<sub>3</sub>:Yb,Er,Tm;  
 BaYF<sub>5</sub>:Yb,Er; Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Dy; GaN:A (A = Pr, Eu, Er, Tm); Bi<sub>4</sub>Ge<sub>3</sub>O<sub>12</sub>; LiNbO<sub>3</sub>:Nd,Yb;  
 LiNbO<sub>3</sub>:Er; LiCaAlF<sub>6</sub>:Ce; LiSrAlF<sub>6</sub>:Ce; LiLuF<sub>4</sub>:A (A = Pr, Tm, Er, Ce);  
 25 Li<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>:Mn, SiO<sub>x</sub>:Er,Al (0 ≤ x ≤ 2).  
 Besonders bevorzugt werden folgende Materialien als Iad-Nanoteilchen verwendet:  
 YVO<sub>4</sub>:Eu, YVO<sub>4</sub>:Sm, YVO<sub>4</sub>:Dy, LaPO<sub>4</sub>:Eu, LaPO<sub>4</sub>:Ce, LaPO<sub>4</sub>:Ce,Tb,  
 LaPO<sub>4</sub>:Ce,Dy, LaPO<sub>4</sub>:Ce,Nd, ZnS:Tb, ZnS:TbF<sub>3</sub>, ZnS:Eu, ZnS:EuF<sub>3</sub>, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu,  
 Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Eu, Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>:Eu, SiO<sub>2</sub>:Dy, SiO<sub>2</sub>:Al, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Tb, CdS:Mn, ZnS:Tb, ZnS:Ag,  
 30 ZnS:Cu. Unter den besonders bevorzugten Materialien werden insbesondere diejenigen ausgewählt, die eine kubische Gitterstruktur des Wirtsgitters besitzen, da bei

diesen Materialien die Zahl der einzelnen Fluoreszenzbanden minimal wird. Beispiele hierfür sind: MgF<sub>2</sub>:Mn; ZnS:Mn, ZnS:Ag, ZnS:Cu, CaSiO<sub>3</sub>:Ln, CaS:Ln, CaO:Ln, ZnS:Ln, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Ln, oder MgF<sub>2</sub>:Ln (Ln = Lanthaniden).

5 Die einfache Nachweissonde enthält lumineszierende anorganische dotierte Nanoteilchen (lad-Nanoteilchen), die nach Anregung mit einer Strahlungsquelle durch Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung der Anregungsstrahlung oder durch Emission von Fluoreszenzlicht nachweisbar sind und deren Oberfläche so präpariert ist, dass Affinitätsmoleküle zum Nachweis einer biologischen oder sonstigen organischen Substanz an diese präparierte Oberfläche ankoppeln können.

10

Die Präparation der Oberfläche kann darin bestehen, dass die Oberfläche der lad-Nanoteilchen chemisch modifiziert ist und/oder reaktive Gruppen und/oder kovalent oder nicht-kovalent gebundene Verbindungsmoleküle aufweist.

15 Als Beispiel einer chemischen Modifikation der Oberfläche des lad-Nanoteilchens sei die Umhüllung des lad-Nanoteilchens mit Silica genannt: Silica ermöglicht eine einfache chemische Konjugation von organischen Molekülen, da Silica sehr leicht mit organischen Linkern wie z.B. Triethoxysilanen oder Chlorsilanen reagiert.

20 Eine weitere Möglichkeit der Präparation der Oberfläche der lad-Nanoteilchen besteht darin, die oxidischen Übergangsmetallverbindungen, aus denen die lad-Nanoteilchen bestehen, mit Chlorgas oder organischen Chlorierungsagenzien in die entsprechenden Oxichloride zu überführen. Diese Oxichloride reagieren ihrerseits mit Nukleophilen wie z.B. Aminogruppen unter Bildung von Übergangsmetallstickstoffverbindungen. Auf diese Weise lässt sich zum Beispiel über die Aminogruppen von Lysinseitenketten eine direkte Konjugation von Proteinen erzielen. Die Konjugation mit Proteinen nach der Oberflächenmodifikation mit Oxichloriden kann auch durch Verwendung eines bifunktionellen Linkers wie Maleimidopropionsäurehydrazid bewerkstelligt werden.

25

30

Für nicht-kovalente Verknüpfungen eignen sich dabei besonders kettenförmige Moleküle mit einer der Oberfläche des Iad-Nanoteilchen entgegengesetzten Polarität oder Ladung. Als Beispiele für Verbindungs moleküle, die nicht-kovalent mit den Iad-Nanoteilchen verknüpft sind, seien anionische, kationische oder zwitterionische 5 Detergenzien, saure oder basische Proteine, Polyamine, Polyamide oder Polysulfon- oder Polycarbonsäuren genannt. Die Adsorption dieser Moleküle auf die Oberfläche des Iad-Nanoteilchens lässt sich durch einfache Koinkubation erzielen. Die Anbindung eines Affinitätsmoleküls an diese nicht-kovalent gebundenen Verbindungs moleküle kann dann mit Standardmethoden der Organischen Chemie erfolgen wie Oxidation, Halogenierung, Alkylierung, Acylierung, Addition, Substitution oder Amidierung des adsorbierten oder adsorbierbaren Materials. Diese Methoden zur Anbindung 10 eines Affinitätsmoleküls an das nicht-kovalent gebundene Verbindungs molekül, kann vor Adsorption an das Iad-Nanoteilchen auf das Verbindungs molekül angewendet werden, oder nachdem es bereits an das Iad-Nanoteilchen adsorbiert ist.

15

Nicht nur die Oberfläche der Iad-Nanoteilchen kann reaktive Gruppen aufweisen, sondern auch die angebundenen Verbindungs moleküle können ihrerseits auch reaktive Gruppen aufweisen, die als Anknüpfungspunkte an der Oberfläche des Iad- 20 Nanoteilchens oder an weiteren Verbindungs molekülen oder Affinitätsmolekülen dienen können. Solche reaktiven Gruppen, die sowohl geladen, ungeladen oder mit Partialladungen versehen sein können, können sowohl an der Oberfläche der Iad- Nanoteilchen als auch Teil der Verbindungs moleküle sein. Mögliche reaktive funktionale Gruppen können Aminogruppen, Carbonsäuregruppen, Thiole, Thioether, Disulfide, Imidazole, Guanidine, Hydroxylgruppen, Indole, vicinale Diole, 25 Aldehyde, alpha-Haloacetylgruppen, N-Maleimide, Quecksilberorganyle, Arylhalogenide, Säureanhydride, Isocyanate, Isothiocyanate, Sulfonsäurehalogenide, Imido- ester, Diazoacetate, Diazoniumsalze, 1,2-Diketone, alpha-beta-ungesättigte Carbonylverbindungen, Phosphonsäuren, Phosphorsäureester, Sulfonsäuren, Azolide oder Derivate der genannten Gruppen sein.

30

Auch Nukleinsäuremoleküle können als Verbindungsmoleküle dienen. Sie bilden die Verbindung zu einem Affinitätsmolekül, das seinerseits Nukleinsäuremoleküle mit zu den Verbindungsmolekülen komplementären Sequenzen enthält.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin die Bereitstellung einer erweiterten Nachweissonde, die aus einer Kombination der einfachen Nachweissonde mit einem oder mehreren Affinitätsmolekülen oder mehreren miteinander gekoppelten Affinitätsmolekülen besteht. Diese Affinitätsmoleküle bzw. die Kombination verschiedener Affinitätsmoleküle werden auf Basis ihrer spezifischen Affinität gegenüber der biologischen Substanz ausgewählt, um deren Präsenz oder Abwesenheit nachzuweisen zu können. Es kann dabei jedes Molekül oder jede Kombination von Molekülen als Affinitätsmoleküle verwendet werden, die sich einerseits an die einfachen Nachweissonden konjugieren lassen und andererseits spezifisch an die nachzuweisende biologische oder sonstige organische Substanz anbinden. Die einzelnen Be-  
10 standteile einer Kombination von Molekülen können gleichzeitig oder nacheinander auf die einfachen Nachweissonden aufgebracht werden.  
15

Generell können solche Affinitätsmoleküle verwendet werden, wie sie auch bei den im Stand der Technik beschriebenen fluoreszierenden organischen Farbstoffmolekülen benutzt werden, um diese spezifisch an die nachzuweisende biologische oder sonstige organische Substanz zu binden. Ein Affinitätsmolekül kann ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, ein anderes Protein, ein Peptid, ein Oligonukleotid, ein Plasmid oder ein anderes Nukleinsäuremolekül, ein Oligo- oder Polysaccharid oder ein Hapten, wie Biotin oder Digoxin oder ein niedermolekulares synthetisches oder natürliches Antigen sein. Eine Liste solcher Moleküle sind in der allgemein zugänglichen Literatur veröffentlicht, z. B. in „Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals“ (7<sup>th</sup> edition, CD-ROM) von R. P. Hauglund, Molecular Probes, Inc..  
20  
25

30 Die Affinität der erweiterten Nachweissonde gegenüber dem nachzuweisenden biologischen Agens ist im allgemeinen dadurch gegeben, dass die einfache Nachweis-

sonde mit einem - normalerweise organischen - Affinitätsmolekül gekoppelt ist, das die gewünschte Affinität gegenüber dem nachzuweisenden Agens besitzt. Dabei werden reaktive Gruppen auf der Oberfläche des Affinitätsmoleküls und der einfachen Nachweissonde genutzt, um diese beiden kovalent oder nicht-kovalent zu binden. 5 Reaktive Gruppen auf der Oberfläche des Affinitätsmoleküls sind dabei Aminogruppen, Carbonsäuregruppen, Thiole, Thioether, Disulfide, Imidazole, Guanidine, Hydroxylgruppen, Indole, vicinale Diole, Aldehyde, alpha-Haloacetylgruppen, N-Maleimide, Quecksilberorganyle, Arylhalogenide, Säureanhydride, Isocyanate, Isothiocyanate, Sulfonsäurehalogenide, Imidoester, Diazoacetate, Diazoniumsalze, 10 1,2-Diketone, alpha-beta-ungesättigte Carbonylverbindungen oder Azolide. Auf der Oberfläche der einfachen Nachweissonde können die weiter oben beschriebenen Gruppen zur Konjugation des Affinitätsmoleküls verwendet werden.

Als eine unter vielen Möglichkeiten, eine einfache Nachweissonde mit einem Protein 15 als Affinitätsmolekül zu verknüpfen, sei die folgende Reaktion genannt. Ein Silika-überzogenes Iad-Nanoteilchen reagiert mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (Pierce, Rockford, IL, USA) und es folgt anschließend eine SMCC-Aktivierung (Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexan-1-carboxylat) (Pierce). Die für die Reaktion an dieses aktivierte Iad-Nanoteilchen benötigten proteingebundenen Thiolgruppen 20 können durch die Reaktion eines Lysin enthaltenden Proteins mit 2-Iminothiolan (Pierce) erzeugt werden. Dabei reagieren Lysinseitenketten des zu konjugierenden Proteins mit 2-Iminothiolan unter Ringöffnung und Thioamidinbildung. Die dabei gebildeten, kovalent mit dem Protein verknüpften Thiolgruppen vermögen dann in einer Hetero-Michael Addition mit den auf die Oberfläche der einfachen Nachweis- 25 sonde konjugierten Maleimidgruppen reagieren, um eine kovalente Bindung zwischen Protein als Affinitätsmolekül und der einfachen Nachweissonde auszubilden.

Neben der oben genannten Möglichkeit, erweiterte Nachweissonden durch Kopplung 30 aus Affinitätsmolekül und einfacher Nachweissonden zu bilden, gibt es zahllose andere Verfahren, die aus der bekannten Reaktivität zahlreicher käuflicher Linker-Moleküle ableitbar sind.

Außer kovalenten Verknüpfungen zwischen einfacher Nachweissonde und Affinitätsmolekül sind nicht-kovalente, selbst-organisierte Verbindungen realisierbar. Als eine Möglichkeit sei hierbei die Verknüpfung von einfachen Nachweissonden mit 5 Biotin als Verbindungsmolekül mit Avidin- oder Streptavidin- gekoppelten Affinitätsmolekülen genannt.

Eine weitere nicht-kovalente selbst-organisierte Verbindung zwischen einfacher Nachweissonde und Affinitätsmolekül besteht in der Wechselwirkung von einfachen 10 Nachweissonden enthaltend Nukleinsäuremoleküle mit komplementären Sequenzen, die auf die Oberfläche eines Affinitätsmoleküls konjugiert sind.

Eine erweiterte Nachweissonde kann auch dadurch gebildet werden, dass Nuklein- 15 säuresequenzen direkt an die präparierte Oberfläche einer einfachen Nachweissonde gebunden sind oder die reaktive Gruppe eines Affinitätsmoleküls bilden. Eine solche erweiterte Nachweissonde wird für den Nachweis von Nukleinsäuremolekülen mit komplementären Sequenzen verwendet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung 20 einer einfachen Nachweissonde, ein Verfahren zur Herstellung der erweiterten Nachweissonde und ein Verfahren zum Nachweis einer bestimmten Substanz in einem biologischen Material.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der einfachen Nachweissonde ent- 25 hält die Schritte:

- a) Herstellung von Iad-Nanoteilchen
- b) chemische Modifikation der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen und /oder
- c) Herstellung reaktiver Gruppen auf der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen

30 und/oder

d) Verbindung eines oder mehrerer Verbindungs moleküle mit der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen durch kovalente oder nicht-kovalente Bindung.

5 Bevorzugt ist die Verteilungsbreite der Ausdehnungen der in Schritt a) hergestellten Iad-Nanoteilchen auf einen Bereich von +/-20 % einer mittleren Ausdehnung eingeschränkt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der erweiterten Nachweissonde enthält die Schritte:

10

e) Bereitstellung der einfachen Nachweissonde  
f) Modifikation der Oberfläche eines Affinitätsmoleküls, um reaktive Gruppen einzuführen, die eine Konjugation mit dem Verbindungs molekül erlauben  
g) Konjugation des aktivierten Affinitätsmoleküls und der einfachen Nachweis-  
sonde.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis einer bestimmten Substanz in einem biologischen Material enthält die Schritte:

20

h) Zusammenführen der erweiterten Nachweissonde und des biologischen und/oder organischen Materials  
i) Abtrennung von erweiterten Nachweissenden, die keine Bindung eingegan-  
gen sind  
j) Belichtung des Materials mit einer elektromagnetischen Strahlung oder mit  
25 einem Teilchenstrahl  
k) Messung des Fluoreszenzlichtes oder Messung der Absorption und/oder  
Streuung und/oder Beugung der Strahlung oder der Änderung derselben.

25

30

Zum Nachweis eines Analyten in einem zu untersuchenden biologischen Material, wird die erweiterte Nachweissonde mit einem zu untersuchenden Material kontaktiert. Bei dem zu untersuchenden biologischen Material kann es sich um Serum,

Zellen, Gewebeschnitte, Rückenmarksflüssigkeit, Sputum, Plasma, Urin oder jede andere beliebige Probe humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs handeln.

Dabei sollte der zu untersuchende Analyt vorzugsweise bereits immobilisiert sein  
5 oder sich in einer simultan oder konsekutiv ablaufenden Bildung supermolekularer Verbände immobilisieren lassen. Beispiel für solche Immobilisierungen ist ein ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) bei dem die zu detektierenden Antigene durch adsorbierte oder anderweitig gebundene Erstantikörper spezifisch an einer festen Phase angebunden sind. Eine Immobilisierung des zu detektierenden  
10 Antigens ist auch leicht realisierbar, wenn es in einem existierenden Zellverband, wie einem Gewebeschnitt, oder in auf einer Unterlage fixierten Einzelzellen enthalten ist.

Bringt man den derartig immobilisierten Analyten mit den erweiterten Nachweissonden in Kontakt, so werden diese über das in ihnen enthaltene Affinitätsmolekül spezifisch an den Analyten anbinden. Ein Überschuss an erweiterten Nachweissonden lässt sich leicht wegwaschen, und es verbleiben nur spezifisch gebundene erweiterte Nachweissonden in der zu untersuchenden Probe. Bei Bestrahlung der so vorbereiteten Probe mit einer geeigneten Energiequelle lässt sich die Anwesenheit der erweiterten Nachweissonde, die das lad-Teilchen enthält, durch die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes oder durch die Messung von Änderungen in der absorbierten, gestreuten oder gebeugten Strahlung nachweisen. Damit wird das Vorhandensein derjenigen biologischen und/oder organischen Substanzen detektiert, die eine geeignete Affinität gegenüber der erweiterten Nachweissonde aufweisen. Auf diese Weise lassen sich Substanzen unabhängig von ihrer chemischen Natur in einem Assay qualitativ und quantitativ nachweisen, solange ein anderes Molekül mit einer genügend hohen Affinität ihnen gegenüber existiert. Die erweiterten Nachweissonden sind dadurch spezifisch, dass an der Oberfläche der in ihnen enthaltenen einfachen Nachweissonden ein solches Affinitätsmolekül angebunden ist, das eine hohe spezifische Bindungskonstante mit der nachzuweisenden biologischen Substanz  
20 besitzt. Auf diese Weise lassen sich auch bestimmte Zelltypen (zum Beispiel Krebszellen) nachweisen. Dabei können zelltypspezifische Biomoleküle, auf der Zellober-  
25  
30

fläche oder auch im Inneren der Zelle mit den Nachweis sonden markiert und optisch über ein Mikroskop oder über ein Flow Cytometer nachgewiesen werden.

Nach dem oben beschriebenen Nachweisprinzip können auch mehrere verschiedene Analyte gleichzeitig in einem biologischen und/oder organischen Material nachgewiesen werden (Multiplexing). Dies geschieht indem das zu untersuchende biologische und/oder organische Material gleichzeitig mit verschiedenen Nachweis sonden in Verbindung gebracht wird. Die verschiedenen Nachweis sonden unterscheiden sich dadurch voneinander, dass ihre Affinitätsmoleküle an verschiedene Analyte anbinden und die in ihnen enthaltenen lad-Nanoteilchen bei verschiedenen Wellenlängen absorbieren, streuen, beugen oder Fluoreszenzlicht emittieren.

Die erfindungsgemäße Nachweis sonde ist stabil gegenüber der eingestrahlten Energie sowie stabil gegenüber Sauerstoff oder Radikalen. Das Material, aus dem die erfindungsgemäßen Nachweis sonden bestehen, ist nicht-toxisch oder nur gering toxisch. Eine sehr enge Verteilungsbreite der Größe der lad-Nanoteilchen ist nicht notwendig, da die spektrale Lage der Fluoreszenzbanden und deren Bandbreiten von der Dotierung und nicht wesentlich von der Größe der lad-Nanoteilchen abhängt. Ebenso ist keine anorganische Hülle um die Teilchen zur Stabilisierung der Fluoreszenzausbeute erforderlich. Sie kann jedoch zur Erleichterung der Konjugationschemie verwandt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Anregung durch eine einzige breit- oder schmalbandige Strahlungsquelle erfolgen kann, da die Absorptionswellenlänge der anregenden Strahlung bzw. die Anregungswellenlänge der Teilchen nicht mit der Emissionswellenlänge korreliert ist. Außerdem erlaubt eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung die Trennung des spezifischen Fluoreszenzlichtes von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz, da die Lebensdauer des durch die äußere Strahlungsquelle angeregten Zustandes in dem lad-Teilchen, der dann zur Lichtemission führt, meist wesentlich länger ist als die der Hintergrundfluoreszenz.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nachweis sonde und des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt vorzugsweise in der medizinischen Diagnostik und in der

Screeningtechnik, insbesondere dort, wo die Markierung spezifischer Substanzen zum Zwecke ihres Nachweises, ihrer Lokalisierung und/oder ihrer Quantifizierung eine besondere Rolle spielt. Dazu zählen der Nachweis spezifischer Antikörper in diagnostischen Assays, die mit Blut oder anderen Körpermaterialien durchgeführt werden. Die erfindungsgemäßen Nachweissonden können aber auch in der zellulären Analytik verwendet werden, das heißt zum Nachweis spezieller Zellen, wie Krebszellen. Bei den genannten Verwendungsmöglichkeiten bieten die erfindungsgemäßen Nachweissonden besondere Vorteile, da hier die Möglichkeit des Multiplexing, also der simultane Nachweis verschiedener Antigene in einem Assay oder sogar in einer einzigen Zelle, ausgenutzt werden kann.

**Beispiele****Beispiel 1: Die Herstellung von Iod-Nanoteilchen bestehend aus YVO<sub>4</sub>:Ln**

5 Der erste Schritt besteht in der Bereitstellung von YVO<sub>4</sub>:Ln. YVO<sub>4</sub>:Ln kann nach dem in K. Riwozki, M. Haase; Journal of Physical Chemistry B; Vol. 102, 1998, Seite 10130, linke Spalte angegebenen Verfahren hergestellt werden. In einem Teflonbehälter wird 3,413 g Y(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (8,9 mmol) und 0,209 g Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,47 mmol) in 30 ml destilliertem Wasser gelöst. Dazu wird unter Röhren 2,73 g

10 Na<sub>3</sub>(VO<sub>4</sub>)·10H<sub>2</sub>O, das in 30 ml destilliertem Wasser gelöst wurde, gegeben. Nach 20 min weiterem Röhren wird der Teflonbehälter in einen Autoklaven gestellt und unter weiterem Röhren auf 200°C erhitzt. Nach 1h wird die Dispersion aus dem Autoklaven entnommen und bei 3000g 10 min zentrifugiert. Der Feststoffanteil wird extrahiert und in 40 ml destilliertem Wasser aufgenommen. 3220 g einer wässrigen 1-

15 Hydroxyethan-1,1-Diphophonsäure-Lösung (60 Gew.-%) wird zu der Dispersion gegeben (9,38 mmol). Zur Entfernung von Y(OH)<sub>3</sub>, das sich aus überschüssigen Yttriumionen gebildet hat, wird der pH-Wert mit HNO<sub>3</sub> auf 0,3 eingestellt und 1h gerührt. Dabei bildet sich kolloidales V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, das sich durch eine rötliche Färbung der Lösung bemerkbar macht. Danach wird der pH-Wert mit NaOH auf 12,5 eingestellt

20 und über Nacht in einem geschlossenen Behälter gerührt. Die resultierende weiße Dispersion wird dann bei 3000g für 10 min. zentrifugiert und der Überstand mit seinen Nebenprodukten entfernt. Der Niederschlag besteht aus YVO<sub>4</sub>:Eu und kann mit 40 ml destilliertem Wasser aufgenommen werden.

25 Zur Isolation der Nanoteilchen, die kleiner als ca. 30 nm sind, wird die Dispersion bei 3000g für 10 min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und zurückgestellt. Anschließend wurde der Niederschlag noch einmal mit 40 ml destilliertem Wasser aufgenommen, bei 3000g für 10 min. zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dieser und der zurückgestellte Überstand wurden zusammen gegeben und bei

30 60000g 10 min zentrifugiert. Der hieraus resultierende Überstand enthält die gewünschten Teilchen. Nach einem weiteren Dialyseschritt (Dialyseschlauch Serva,

MWCO 12 – 14 kD) erhält man eine kolloidale Lösung, aus der durch Trocknung mit einem Rotationsverdampfer (50°C) ein redispersierbares Pulver gewonnen werden kann.

5 **Beispiel 2: Die Herstellung von Iad-Nanoteilchen bestehend aus LaPO<sub>4</sub>:Eu**

Der erste Schritt besteht in der Bereitstellung von LaPO<sub>4</sub>:Eu. LaPO<sub>4</sub>:Eu kann nach dem in H. Meyssamy, K. Riwotzki, A. Kornowski, S. Naused, M. Haase; Advanced Materials, Vol. 11, Issue 10, 1999, Seite 843, rechte Spalte unten bis Seite 844, linke Spalte oben angegebenen Verfahren hergestellt werden. In einem Teflontopf wird 12,34 g La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (28,5 mmol) und 0,642 g Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (1,5 mmol) in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und in 100 ml NaOH (1 M) gegeben. Dazu wird unter Rühren eine Lösung aus 3,56 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (27 mmol) in 100 ml destilliertem Wasser gegeben. Die Lösung wird mit NaOH (4 M) auf pH 12,5 eingestellt und in 10 einem Autoklaven 2 h bei 200°C unter kräftigem Rühren erhitzt. Die Dispersion wird 15 dann bei 3150g 10 min. zentrifugiert und der Überstand entfernt. Um unerwünschtes La(OH)<sub>3</sub> zu entfernen, wird der Niederschlag in HNO<sub>3</sub> (1M) dispergiert und 3 Tage gerührt (pH 1). Danach wird die Dispersion zentrifugiert (3150g, 5 min) und der Überstand entfernt. Dem Zentrifugat wird unter Rühren 40 ml destilliertes Wasser 20 zugesetzt.

Die milchige Dispersion enthält noch eine breite Größenverteilung. Zur Isolation der Nanoteilchen, die kleiner als ca. 30 nm sind, werden in vollständiger Analogie zu Beispiel 1 entsprechende Zentrifugations- und Dekantierungsschritte nachgeschaltet.

25

**Beispiel 3: Die Herstellung von Iad-Nanoteilchen bestehend aus LaPO<sub>4</sub>:Ce, Tb**

Der erste Schritt besteht in der Bereitstellung von LaPO<sub>4</sub>:Ce,Tb. 300 ml Trisethylhexylphosphat werden in einem trockenen Stickstoff-Gasstrom gespült. Anschließend werden 7,43 g LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O (20 mmol), 8,38 g CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O (22,5 mmol) 30 und 2,8 g TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (7,5 mmol) in 100 ml Methanol gelöst und hinzugegeben.

Danach wird Wasser und Methanol durch Heizen der Lösung auf 30°C bis 40°C im Vakuum abdestilliert. Eine frisch hergestellte Lösung bestehend aus 4,9 g kristalliner Phosphorsäure (50 mmol), die in einer Mischung aus 65,5 ml Trioctylamin (150 mmol) und 150 ml Trisethylhexylphosphat gelöst wurden, werden anschließend hinzugegeben. Die klare Lösung muss rasch in ein zu evakuierendes Gefäß gestellt und mit Stickstoff-Gasstrom gespült werden, um die Oxidation von Ce<sup>3+</sup> bei einer Temperaturerhöhung zu minimieren. Anschließend wird die Lösung auf 200°C erhitzt. Während der Heizphase werden einige der Phosphorsäureester-Gruppen gespalten, was zu einer allmählichen Erniedrigung der Siedepunktes führt. Die Heizphase wird beendet, wenn die Temperatur auf 175°C fällt (ca. 30 bis 40 h). Nachdem die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt ist, wird ein 4-facher Überschuss an Methanol hinzugegeben, was zu einer Ausfällung der Nanoteilchen führt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mit Methanol gewaschen und getrocknet.

15 **Beispiel 4: Die Herstellung von Iad-Nanoteilchen bestehend aus LaPO<sub>4</sub>:Eu**

490 mg (5,0 mmol) kristalline Phosphorsäure und 6,5 ml (15 mmol) Trioctylamin werden in 30 ml Trisethylhexylphosphat gelöst. Anschließend werden 1,76 g La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>•7H<sub>2</sub>O (4,75 mmol) und 92 mg EuCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O (0,25 mmol) in 50 ml Trisethylhexylphosphat gelöst und mit der ersten Lösung vereint. Die resultierende Lösung wird unter Vakuum entgast und anschließend für 16 h unter Stickstoff bei 200°C geheizt. Während der Heizphase werden einige der Phosphorsäureester-Gruppen gespalten, was zu einer allmählichen Erniedrigung der Siedepunktes führt. Die Heizphase wird beendet, wenn die Temperatur auf 180°C fällt. Nachdem die Lösung auf Zimmertemperatur abgekühlt ist, wird Methanol hinzugegeben, was zu einer Ausfällung der Nanoteilchen führt. Der Niederschlag wird mit Hilfe einer Zentrifuge abgetrennt, mit Methanol zweimal gewaschen und getrocknet.

**Beispiel 5: Umhüllung der in Beispiel 2 dargestellten Nanopartikel mit einer SiO<sub>2</sub>-Hülle**

1 g der nach Beispiel 2 hergestellten LaPO<sub>4</sub>:Eu-Nanoteilchen werden unter intensivem Rühren mit einem Magnetrührer bei 900 Upm in 100 ml Wasser gegeben und mit Tetrabutylammoniumhydroxid auf einen pH-Wert von 12 eingestellt. Die Dispersion wird dann unter intensivem Rühren mit 500 mg Natrium-Wasserglas (26,9% SiO<sub>2</sub>; 8,1 % Na<sub>2</sub>O) versetzt. Anschließend werden ebenfalls unter intensivem Rühren tropfenweise 50 ml Ethanol hinzugegeben. Der entstandene Niederschlag wird abzentrifugiert und der Rückstand in 50 ml deionisiertem Wasser im Ultraschallbad redispergiert. Die Dispersion wird dann durch Dekantieren vom nicht dispergierten Anteil getrennt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei einem Druck von 10 mbar und einer Temperatur von 80°C getrocknet.

15 **Beispiel 6: Die Konjugation von den in Beispiel 5 dargestellten Nanopartikeln mit anti- $\alpha$ -Aktin Antikörpern**

100 mg der in Beispiel 5 synthetisierten Silika-umhüllten Nanoteilchen werden in 10 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) dispergiert und mit 100  $\mu$ L N-Methylmorpholin versetzt. Zu der Lösung gibt man 0.5 mL einer 10%igen Lösung von 3-Aminopropyltriethoxsilan in THF. Die Lösung wird im fest verschlossenen Gefäß über Nacht bei 40°C gerührt. Die Lösung wird mit 5 mL Wasser versetzt, 1 h bei Raumtemperatur nachgerührt und mit einer Glassfritte (4G, Schott) von eventuell ausgefallenem Material abfiltriert. Das Filtrat wird in Ultrafiltrationsröhren (Centri-con, Amicon, Ausschlussgröße 10, kD) in TSE7-Puffer umgepuffert. (TSE7: 100 mmol Triethanolamin, 50 mmol Natriumchlorid, 1 mmol EDTA in Wasser, pH 7.3). Das Zielvolumen beträgt 2 mL, der Austauschfaktor 1000. Die von der Ultrafiltrationsmembran zurückgehaltenen amino-aktivierten Nanopartikel in 2 mL TSE7 Puffer werden mit 500  $\mu$ L einer 20 mmol Lösung von sSMCC (Sulfosuccimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexancarboxylat (Pierce, Rockwell, IL, USA) versetzt und 60 Minuten bei 25°C gerührt. Die erhaltene Mischung wird wie oben beschrieben in 10

kD Centriconröhren in TSE7 Puffer umgepuffert und auf 2 mL eingeengt. Dieser Schritt wird bei 5°C durchgeführt. Die erhaltene Lösung ist im Kühlschrank 12 h stabil. 10 mg monoklonaler anti Aktin Antikörper (Sigma) werden mit Centricon Ultrafiltrationsröhren (Ausschlussgröße 50 kD) in TSE8 Buffer überführt (Austauschfaktor 1000, TSE8: (100 mmol Triethanolamin, 50 mmol Natriumchlorid, 1 mmol EDTA in Wasser, pH 8.5). Die Proteinkonzentration wird auf 7-8 mg/mL eingestellt. Zu der Antikörperlösung gibt man 150 µL einer 10 mM Lösung von 2-Imminothiolan in TSE8 Puffer und lässt die Mischung 15 Minuten reagieren. Der so Thiol-aktivierte Antikörper wird wie oben beschrieben bei 4°C mit TSE8 Puffer umgepuffert, um nicht reagierte Aktivatormoleküle zu entfernen und auf 2 mL eingeengt. Die aktivierte Nanopartikel und den aktivierte Antikörper enthaltenden Lösungen werden vereinigt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die so erhaltene Dispersion des erweiterten Nachweisteilchen wird von nicht umgesetztem Antikörper durch Gelmermeationschromatographie auf Superdex 200 (Pharmacia) gereinigt. Als Laufpuffer wird TSE7 verwendet. Die Retentionszeit für den unkonjugierten erweiterten lad-Nanopartikel beträgt etwa 2 Stunden.

**Beispiel 7: Die Konjugation von in Beispiel 1 dargestellten lad-Nanopartikeln mit anti Myoglobin Antikörpern**

100 mg der in Beispiel 1 dargestellten Vanadat-Nanopartikel werden in einem Glasrohr im Argonstrom mit einem Heizband erhitzt. Nach Ausheizen der Partikel für etwa eine Stunde werden dem Gasstrom für etwa 3 min 3-5 Vol.% Chlorgas zudosiert. Die erforderliche Reaktionszeit hängt wesentlich von der Partikelgröße ab und sollte daher eventuell mit derselben Charge von Nanopartikeln austitriert werden. Man lässt die Partikel im Argonstrom abkühlen und gibt die partiell chlorierten Nanopartikel in 5 mL einer 50 mM Lösung von N-Maleimidopropionsäurehydrazid (Pierce) und röhrt über Nacht bei 20°C. Die so erhaltene Lösung wird am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingeengt und wie in Beispiel 6 beschrieben mit Ultrafiltrationsröhren in TSE7 umgepuffert. Die erhaltene Dispersion ist bei 5°C 12 h stabil. 10 mg polyklonaler Kaninchen anti-Myoglobin Antikörper (Dako) wer-

den mit Centricon Ultrafiltrationsröhren (Ausschlussgröße 50 kD) in TSE8 Buffer überführt (Austauschfaktor 1000, TSE8: (100 mmol Triethanolamin, 50 mmol Natriumchlorid, 1 mmol EDTA in Wasser, pH 8.5). Die Proteinkonzentration wird auf 7-8 mg/mL eingestellt. Zu der Antikörperlösung gibt man 150 µL einer 10 mM Lösung von 2-Imminothiolan in TSE8 Puffer und lässt die Mischung 15 Minuten reagieren. 5 Der so Thiol-aktivierte Antikörper wird wie oben beschrieben bei 4°C mit TSE8 Puffer umgepuffert, um nicht reagierte Aktivatormoleküle zu entfernen und auf 2 mL eingeengt. Die aktivierte Nanopartikel und den aktivierte Antikörper enthaltenden Lösungen werden vereinigt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die so erhaltene Dispersion des erweiterten Nachweisteilchen wird von nicht umgesetztem 10 Antikörper durch Gelmermeationschromatographie auf Superdex 200 (Pharmacia) gereinigt. Als Laufpuffer wird TSE7 verwendet. Die Retentionszeit für den erweiterten lad-Nanopartikel beträgt etwa 2 Stunden.

15 **Beispiel 8: Visualisierung von Aktin Filamenten in Kaninchen Muskelzellen durch Nanopartikel Fluoreszenz**

Ein mit einem Gefriermicroton geschnittener Dünnschnitt eines Kaninchenmuskels wird auf einen Objektträger aufgebracht und für 3 Minuten in eiskalten Ethanol fixiert. Der auf den Objektträger aufgebrachte Dünnschnitt wird anschließend zwei 20 Mal mit PBS-Tween Buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 % Tween 20) gewaschen und dabei für jeweils 5 min in dem Waschpuffer belassen. Zur Verringerung der nicht spezifischen Bindung wird der Dünnschnitt 30 min bei 20°C in einer Lösung von 1.5 % Schafserum in PBS-Tween 25 Puffer inkubiert und der Dünnschnitt wie oben beschrieben zwei Mal gewaschen. Die in Beispiel 6 beschriebene Lösung des erweiterten Nachweisteilchens wird 1:100 mit PBS-S (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 % Tween 20, 1.5% Schafserum) verdünnt und der Dünnschnitt in dieser Lösung bei 20°C eine Stunde inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird sie wie oben 30 beschrieben gewaschen. Die Detektion erfolgt nach Anregung mit einem Argon Ionen Laser bei Wellenlängen zwischen 333 nm und 364 nm durch Messung des Fluores-

zenzlichts bei einer Wellenlänge von 591 nm. Benutzt wurde hierfür ein Konfokales Laserscanning Mikroskop der Firma Leica, Typ TCS NT .

**Beispiel 9: Nachweis von Myoglobin in humanem Serum durch Nanopartikel**  
5 **Fluoreszenz**

Monoklonaler anti Myoglobin Antikörper (BiosPacific) werden in einer Konzentration von 5 mg/L in C Puffer gelöst (100 mmol Natriumcarbonat in Wasser, pH 9.0. Jeweils 200  $\mu$ L dieser Lösung werden in 96 Wells einer Standard Polystyrol ELISA 10 Platte (Greiner) pipettiert, die Platte versiegelt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wird ausgeklopft und mit 200  $\mu$ L einer 1% BSA Lösung (Bovines Serum Albumin) in TSE7 Puffer (siehe Beispiel 6) geblockt. Man wäscht drei mal mit je 250  $\mu$ L TSET7 Puffer (100 mmol Triethanolamin, 50 mmol Natriumchlorid, 1 mmol EDTA, 0.1% Tween 20 in Wasser, pH 7.3. Man pipettiert jeweils 100  $\mu$ L eines 6-Level 15 Myoglobin Kalibrators (Bayer Immuno 1) und Humanseren in die unterschiedlichen Wells der Mikrotiterplatte und lässt 2h bei Raumtemperatur inkubieren. Die Analyt- lösungen werden aus der Platte aus pipettiert und die Platte drei mal wie oben be- 20 schrieben gewaschen. Zu jedem Well gibt man etwa 1  $\mu$ g der in Beispiel 7 darge- stelltten erweiterten anti Myoglobin Nachweissonde, dispergiert in 100  $\mu$ L TSE7. Man lässt 1 h bei Raumtemperatur inkubieren, wäscht drei mal mit TSET7. Der Readout des ELISAs erfolgt durch Messung der Iad-Nanopartikelfluoreszenz in 25 einem Mikrotiterplattenleser (Tecan).

**Beispiel 10: Lösen der in Beispiel 3 dargestellten Nanopartikel in Wasser durch**  
25 **Umsetzung von Ethylen- oder Polyethylenglykol**

1 g der in Beispiel 3 hergestellten LaPO<sub>4</sub>:Ce,Tb (~5 mMol) werden mit 100 ml Ethylenglykol (~2 Mol) (alternativ können auch Polyethylenglykole verschiedener Kettenlänge, HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-OH, wobei n = 2 - 9, verwendet werden) und 30 100 mg Paratoluolsulfonsäure unter Rühren und Stickstoff auf 200°C erhitzt. Dabei lösen

sich die Partikel und bleiben auch nach Abkühlen auf RT in Lösung. Anschließend wird gegen Wasser über Nacht dialysiert (cut off MW 10-20.000).

5 **Beispiel 11: Funktionalisierung von in Beispiel 10 hergestellten Nanopartikeln durch Oxidation**

Zu 100mg (0,5 mMol in 20 ml Wasser) der in Beispiel 10 dargestellten Nanopartikel wird unter Rühren zunächst 0,5 mL 96-98%ige Schwefelsäure dazugegeben. Tropfenweise wird 1mM KMnO<sub>4</sub> Lösung dazugegeben, bis keine Entfärbung der violetten Farbe mehr auftritt. Man gibt anschließend nochmals dieselbe Menge KMnO<sub>4</sub>- Lösung hinzu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur nachröhren (>12 h). Überschüssiges Permanganat wird durch tropfenweise Zugabe von frisch bereiteter 1mM Natriumsulfit Lösung reduziert. Nacht wird gegen 0,1M MES, 0,5M NaCl, pH 6,0 dialysiert.

15

**Beispiel 12: Die Konjugation von in Beispiel 11 dargestellten Nanopartikeln an anti-Biotin Antikörper**

20 1mg (5nMol) der in Beispiel 11 dargestellten carboxy-funktionalisierten Nanopartikel in 1mL Puffer (0,1 M MES, 0,5 M NaCl, pH 6) werden 0,4 mg EDC (~2mM) und 1,1 mg (~5mM) sulfo-NHS (beide Pierce; Rockford, IL) gegeben und für 15 min bei RT gerührt. Das nicht umgesetzte EDC wird durch Zugabe von 1,4µl 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 20mM) inaktiviert. Polyklonaler Ziege anti.Biotin Antikörper (Sigma) wird in der gleichen molaren Menge (5nMol) in 25 Aktivierungs- Puffer (0,1M MES, 0,5M NaCl, pH 6,0) hinzugefügt und das Gemisch für 2 Std. bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Hydroxylamin (Endkonzentration von 10mM) gestoppt. Die so erhaltene Lösung der erweiterten Nachweisteilchen wird von nicht umgesetzten Antikörper durch Gelmerieations-chromatographie auf Superdex 200 (Pharmacia) gereinigt. Als Laupuffer wird 30 Aktivierungs-Puffer verwendet. Die Retentionszeit für den erweiterten lad-Nanopartikel beträgt etwa 2 Stunden.

Patentansprüche

1. Einfache Nachweissonde enthaltend lumineszierende anorganische dotierte Nanoteilchen (Iad-Nanoteilchen), die nach Anregung mit einer Strahlungsquelle durch Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung der Anregungsstrahlung oder durch Emission von Fluoreszenzlicht nachweisbar sind und deren Oberfläche so präpariert ist, dass Affinitätsmoleküle zum Nachweis einer biologischen oder sonstigen organischen Substanz an diese präparierte Oberfläche ankoppeln können.
- 10 2. Einfache Nachweissonde nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche der Iad-Nanoteilchen chemisch modifiziert ist und/oder kovalent oder nicht-kovalent gebundene Verbindungsmoleküle und/oder reaktive Gruppen aufweist.
- 15 3. Einfache Nachweissonde nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Modifikation der Oberfläche in einer Hülle aus Silika um die Oberfläche des Iad-Nanoteilchens besteht.
- 20 4. Einfache Nachweissonde nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Modifikation in Oxichloriden besteht, die durch die Behandlung von Iad-Nanoteilchen bestehend aus oxidischen Übergangsmetallverbindungen mit Chlorgas oder organischen Chlorierungsagenzien entsteht.
- 25 5. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Verbindungsmolekül ein oder mehrere kettenförmige Moleküle mit einer der Oberfläche des Iad-Nanoteilchens entgegengesetzten Polarität oder Ladung nicht-kovalent mit der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen verbunden sind.

6. Einfache Nachweissonde nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die kettenförmigen Moleküle anionische, kationische oder zwitterionische Detergenzien, saure oder basische Proteine, Polyamine, Polyamide oder Polysulfon- oder Polycarbonsäuren sind.  
5
7. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 2, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche und/oder die mit der Oberfläche des lad-Nanoteilchens verbundenen Verbindungsmoleküle reaktive neutrale, geladene oder partialgeladene Gruppen wie Aminogruppen, Carbonsäuregruppen, Thiole, Thioether, Disulfide, Imidazole, Guanidine, Hydroxylgruppen, Indole, vicinale Diole, Aldehyde, alpha-Haloacetylgruppen, N-Maleimide, Quecksilberorganyle, Arylhalogenide, Säureanhydride, Isocyanate, Isothiocyanate, Sulfonsäurehalogenide, Imidoester, Diazoacetate, Diazoniumsalze, 1,2-Diketone, alpha-beta-ungesättigte Carbonylverbindungen, Azolide, Phosphonsäuren, Phosphorsäureester oder Derivate der genannten Gruppen tragen, wobei diese reaktiven Gruppen eine chemische Bindung mit weiteren Verbindungsmolekülen oder Affinitätsmolekülen erlauben.  
10
8. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass Nukleinsäuremoleküle als Verbindungsmoleküle für ein Affinitätsmolekül enthaltend Nukleinsäuremoleküle mit zu den Verbindungsmolekülen komplementären Sequenzen dient.  
20
9. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Strahlungsquelle eine Quelle für elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen im Bereich des infraroten Lichts, des sichtbaren Lichts, des UV, des Röntgenlichts oder der  $\gamma$ -Strahlung ist oder eine Quelle für Teilchenstrahlung wie Elektronenstrahlung ist.  
25
- 30 10. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die lad-Nanoteilchen Durchmesser im Bereich von 1 nm bis 1

µm, bevorzugt im Bereich von 2 nm bis 100nm, besonders bevorzugt im Bereich von 2 nm bis unter 20 nm und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 nm und 10 nm haben.

- 5 11. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die lad-Nanoteilchen eine nadelförmige Morphologie aufweisen mit einer Breite von 3 nm bis 50 nm, bevorzugt von 3 nm bis unter 20 nm und einer Länge von 20 nm bis 5 µm, bevorzugt von 20 nm bis 500 nm.
- 10 12. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Wirtsmaterial der lad-Nanoteilchen Verbindungen des Typs XY enthält, wobei X ein Kation aus einem oder mehreren Elementen der Hauptgruppen 1a, 2a, 3a, 4a, der Nebengruppen 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b oder der Lanthaniden des Periodensystems ist und Y entweder ein mehratomiges Anion aus einem oder mehreren Element(en) der Hauptgruppen 3a, 4a, 5a, der Nebengruppen 3b, 4b, 5b, 6b, 7b und/oder 8b sowie Element(en) der Hauptgruppen 6a und/oder 7 oder ein einatomiges Anion aus der Hauptgruppe 5a, 6a oder 7a des Periodensystems ist.
- 15 13. Einfache Nachweissonde nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Wirtsmaterial der lad-Nanoteilchen Verbindungen aus der Gruppe der Sulfide, Selenide, Sulfoselenide, Oxysulfide, Borate, Aluminate, Gallate, Silikate, Germanate, Phosphate, Halophosphate, Oxide, Arsenate, Vanadate, Niobate, Tantalate, Sulfate, Wolframate, Molybdate, Alkalihalogenide sowie andere Halogenide oder Nitride enthält.
- 20 14. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Dotierung ein oder mehrere Elemente aus der Gruppe enthaltend Elemente der Hauptgruppen 1a, 2a oder Al, Cr, Tl, Mn, Ag, Cu, As, Nb, Nd, Ni, Ti, In, Sb, Ga, Si, Pb, Bi, Zn, Co und/oder Elemente der Lanthaniden verwendet werden.
- 25
- 30

15. Einfache Nachweissonde nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass auch Kombinationen von zwei oder mehreren dieser Elemente in unterschiedlichen relativen Konzentrationen zueinander als Dotierungsmaterial dienen.

5

16. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Dotierungsmaterials im Wirtsgitter zwischen  $10^{-5}$  mol% und 50 mol%, bevorzugt zwischen 0,01 mol% und 30 mol%, besonders bevorzugt zwischen 0,1 mol% und 20 mol% beträgt.

10

17. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass  $\text{LiI:Eu}$ ;  $\text{NaI:Tl}$ ;  $\text{CsI:Tl}$ ;  $\text{CsI:Na}$ ;  $\text{LiF:Mg}$ ;  $\text{LiF:Mg,Ti}$ ;  $\text{LiF:Mg,Na}$ ;  $\text{KMgF}_3:\text{Mn}$ ;  $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Eu}$ ;  $\text{BaFCl:Eu}$ ;  $\text{BaFCl:Sm}$ ;  $\text{BaFBr:Eu}$ ;  $\text{BaFCl}_{0,5}\text{Br}_{0,5}:\text{Sm}$ ;  $\text{BaY}_2\text{F}_8:\text{A}$  ( $\text{A} = \text{Pr, Tm, Er, Ce}$ );  $\text{BaSi}_2\text{O}_5:\text{Pb}$ ;  $15$   $\text{BaMg}_2\text{Al}_16\text{O}_{27}:\text{Eu}$ ;  $\text{BaMgAl}_{14}\text{O}_{23}:\text{Eu}$ ;  $\text{BaMgAl}_{10}\text{O}_{17}:\text{Eu}$ ;  $\text{BaMgAl}_2\text{O}_3:\text{Eu}$ ;  $\text{Ba}_2\text{P}_2\text{O}_7:\text{Ti}$ ;  $(\text{Ba},\text{Zn},\text{Mg})_3\text{Si}_2\text{O}_7:\text{Pb}$ ;  $\text{Ce}(\text{Mg},\text{Ba})\text{Al}_{11}\text{O}_{19}$ ;  $\text{Ce}_{0,65}\text{Tb}_{0,35}\text{MgAl}_{11}\text{O}_{19}:\text{Ce,Tb}$ ;  $\text{MgAl}_{11}\text{O}_{19}:\text{Ce,Tb}$ ;  $\text{MgF}_2:\text{Mn}$ ;  $\text{MgS:Eu}$ ;  $\text{MgS:Ce}$ ;  $\text{MgS:Sm}$ ;  $\text{MgS:(Sm,Ce)}$ ;  $(\text{Mg},\text{Ca})\text{S:Eu}$ ;  $\text{MgSiO}_3:\text{Mn}$ ;  $20$   $3,5\text{MgO}\cdot 0,5\text{MgF}_2\cdot \text{GeO}_2:\text{Mn}$ ;  $\text{MgWO}_4:\text{Sm}$ ;  $\text{MgWO}_4:\text{Pb}$ ;  $6\text{MgO}\cdot \text{As}_2\text{O}_5:\text{Mn}$ ;  $(\text{Zn},\text{Mg})\text{F}_2:\text{Mn}$ ;  $(\text{Zn}_4\text{Be})\text{SO}_4:\text{Mn}$ ;  $\text{Zn}_2\text{SiO}_4:\text{Mn}$ ;  $\text{Zn}_2\text{SiO}_4:\text{Mn,As}$ ;  $\text{ZnO:Zn}$ ;  $\text{ZnO:Zn,Si,Ga}$ ;  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2:\text{Mn}$ ;  $\text{ZnS:}\text{A}$  ( $\text{A} = \text{Ag, Al, Cu}$ );  $(\text{Zn},\text{Cd})\text{S:}\text{A}$  ( $\text{A} = \text{Cu, Al, Ag, Ni}$ );  $\text{CdBO}_4:\text{Mn}$ ;  $\text{CaF}_2:\text{Mn}$ ;  $\text{CaF}_2:\text{Dy}$ ;  $\text{CaS:}\text{A}$  ( $\text{A} = \text{Lanthanide, Bi}$ );  $(\text{Ca},\text{Sr})\text{S:Bi}$ ;  $\text{CaWO}_4:\text{Pb}$ ;  $\text{CaWO}_4:\text{Sm}$ ;  $\text{CaSO}_4:\text{A}$  ( $\text{A} = \text{Mn, Lanthanide}$ );  $25$   $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\cdot \text{Ca}(\text{F,Cl})_2\cdot \text{Sb,Mn}$ ;  $\text{CaSiO}_3:\text{Mn,Pb}$ ;  $\text{Ca}_2\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_7:\text{Ce}$ ;  $(\text{Ca},\text{Mg})\text{SiO}_3:\text{Ce}$ ;  $(\text{Ca},\text{Mg})\text{SiO}_3:\text{Ti}$ ;  $2\text{SrO}\cdot 6(\text{B}_2\text{O}_3)\cdot \text{SrF}_2:\text{Eu}$ ;  $3\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2\cdot \text{CaCl}_2:\text{Eu}$ ;  $\text{A}_3(\text{PO}_4)_2\cdot \text{ACl}_2:\text{Eu}$  ( $\text{A} = \text{Sr, Ca, Ba}$ );  $(\text{Sr},\text{Mg})_2\text{P}_2\text{O}_7:\text{Eu}$ ;  $(\text{Sr},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2:\text{Sn}$ ;  $\text{SrS:Ce}$ ;  $\text{SrS:Sm,Ce}$ ;  $\text{SrS:Sm}$ ;  $\text{SrS:Eu}$ ;  $\text{SrS:Eu,Sm}$ ;  $\text{SrS:Cu,Ag}$ ;  $\text{Sr}_2\text{P}_2\text{O}_7:\text{Sn}$ ;  $\text{Sr}_2\text{P}_2\text{O}_7:\text{Eu}$ ;  $\text{Sr}_4\text{Al}_{14}\text{O}_{25}:\text{Eu}$ ;  $\text{SrGa}_2\text{S}_4:\text{A}$  ( $\text{A} = \text{Lanthanide, Pb}$ );  $\text{SrGa}_2\text{S}_4:\text{Pb}$ ;  $\text{Sr}_3\text{Gd}_2\text{Si}_6\text{O}_{18}:\text{Pb,Mn}$ ;  $30$   $\text{YF}_3:\text{Yb,Er}$ ;  $\text{YF}_3:\text{Ln}$  ( $\text{Ln} = \text{Lanthanide}$ );  $\text{YLiF}_4:\text{Ln}$  ( $\text{Ln} = \text{Lanthanide}$ );  $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}:\text{Ln}$  ( $\text{Ln} = \text{Lanthanide}$ );  $\text{YAl}_3(\text{BO}_4)_3:\text{Nd,Yb}$ ;  $(\text{Y},\text{Ga})\text{BO}_3:\text{Eu}$ ;

(Y,Gd)BO<sub>3</sub>:Eu; Y<sub>2</sub>Al<sub>3</sub>Ga<sub>2</sub>O<sub>12</sub>:Tb; Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>:Ln (Ln = Lanthanide); Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Ln (Ln = Lanthanide); Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Ln (Ln = Lanthanide); YVO<sub>4</sub>:A (A = Lanthanide, In); Y(P,V)O<sub>4</sub>:Eu; YTaO<sub>4</sub>:Nb; YAlO<sub>3</sub>:A (A = Pr, Tm, Er, Ce); YOCl:Yb,Er; LnPO<sub>4</sub>:Ce,Tb (Ln = Lanthanide oder Mischungen von Lanthaniden) ;

5 LuVO<sub>4</sub>:Eu; GdVO<sub>4</sub>:Eu; Gd<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Tb; GdMgB<sub>5</sub>O<sub>10</sub>:Ce,Tb; LaOBr:Tb; La<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Tb; LaF<sub>3</sub>:Nd,Ce; BaYb<sub>2</sub>F<sub>8</sub>:Eu; NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er; NaGdF<sub>4</sub>:Yb,Er; NaLaF<sub>4</sub>:Yb,Er; LaF<sub>3</sub>:Yb,Er,Tm; BaYF<sub>5</sub>:Yb,Er; Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Dy; GaN:A (A = Pr, Eu, Er, Tm); Bi<sub>4</sub>Ge<sub>3</sub>O<sub>12</sub>; LiNbO<sub>3</sub>:Nd,Yb; LiNbO<sub>3</sub>:Er; LiCaAlF<sub>6</sub>:Ce; LiSrAlF<sub>6</sub>:Ce; LiLuF<sub>4</sub>:A (A = Pr, Tm, Er, Ce); Li<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>:Mn, SiO<sub>x</sub>:Er,Al (0 ≤ x ≤ 2) als Material für die Iad-Nanoteilchen verwendet wird.

10

18. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass YVO<sub>4</sub>:Eu, YVO<sub>4</sub>:Sm, YVO<sub>4</sub>:Dy, LaPO<sub>4</sub>:Eu, LaPO<sub>4</sub>:Ce, LaPO<sub>4</sub>:Ce,Tb, LaPO<sub>4</sub>:Ce,Dy, LaPO<sub>4</sub>:Ce,Nd, ZnS:Tb, ZnS:TbF<sub>3</sub>, ZnS:Eu, ZnS:EuF<sub>3</sub>, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu, Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Eu, Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>:Eu, SiO<sub>2</sub>:Dy, SiO<sub>2</sub>:Al, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Tb, CdS:Mn, ZnS:Tb, ZnS:Ag oder ZnS:Cu als Material für die Iad-Nanoteilchen verwendet wird.

15

19. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass Material mit einer kubischen Gitterstruktur des Wirtsgitters für die Iad-Nanoteilchen verwendet wird.

20

20. Einfache Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass MgF<sub>2</sub>:Mn; ZnS:Mn, ZnS:Ag, ZnS:Cu, CaSiO<sub>3</sub>:Ln, CaS:Ln, CaO:Ln, ZnS:Ln, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Ln, oder MgF<sub>2</sub>:Ln (Ln = Lanthaniden) als Material für die Iad-Nanoteilchen verwendet wird.

25

21. Erweiterte Nachweissonde für biologische Anwendungen bestehend aus einer Kombination der einfachen Nachweissonde nach einem der Ansprüche 1 bis 20 mit einem oder mehreren Affinitätsmolekülen oder mehreren miteinander gekoppelten Affinitätsmolekülen, wobei die Affinitätsmoleküle einerseits an

30

die präparierte Oberfläche der einfachen Nachweissonde anbinden und andererseits an eine biologische oder sonstige organische Substanz binden können.

22. Erweiterte Nachweissonde nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Affinitätsmoleküle monoklonale oder polyklonale Antikörper, Proteine, Peptide, Oligonukleotide, Plasmide, Nukleinsäuremoleküle, Oligo- oder Polysaccharide, Haptene wie Biotin oder Digoxin, oder ein niedermolekulares synthetisches oder natürliches Antigen sind.  
5
- 10 23. Erweiterte Nachweissonde nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Affinitätsmolekül durch reaktive Gruppen am Affinitätsmolekül und an der einfachen Nachweissonde kovalent oder nicht-kovalent an die einfache Nachweissonde gekoppelt ist.
- 15 24. Erweiterte Nachweissonde nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktiven Gruppen auf der Oberfläche des Affinitätsmoleküls Aminogruppen, Carbonsäuregruppen, Thiole, Thioether, Disulfide, Imidazole, Guanidine, Hydroxylgruppen, Indole, vicinale Diole, Aldehyde, alpha-Haloacetylgruppen, N-Maleimide, Quecksilberorganyle, Arylhalogenide, Säureanhydride, Isocyanate, Isothiocyanate, Sulfonsäurehalogenide, Imidoester, Diazoacetate, Diazoniumsalze, 1,2-Diketone, alpha-beta-ungesättigte Carbonylverbindungen oder Azolide sind.  
20
- 25 25. Erweiterte Nachweissonde nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der einfachen Nachweissonde und dem Affinitätsmolekül eine nicht-kovalente, selbst-organisierte Verbindung besteht.
- 30 26. Erweiterte Nachweissonde nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung zwischen Biotin als Verbindungsmolekül der einfachen Nachweissonde und Avidin oder Streptavidin als reaktive Gruppe des Affinitätsmoleküls besteht.

27. Erweiterte Nachweissonde nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung zwischen Nukleinsäuremolekülen als Verbindungs molekülen der einfachen Nachweissonde und Nukleinsäuremolekülen mit dazu komplementären Sequenzen als reaktiver Gruppe des Affinitätsmoleküls besteht.  
5
28. Erweiterte Nachweissonde nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass als Affinitätsmolekül Nukleinsäuresequenzen dienen und die nachzuweisende biologische Substanz aus Nukleinsäuremolekülen mit komplementären Sequenzen besteht.  
10
29. Verfahren zur Herstellung der einfachen Nachweissonde gemäß einem der Ansprüche 1 bis 20 enthaltend die Schritte  
15
  - a) Herstellung von Iad-Nanoteilchen
  - b) chemische Modifikation der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen und/oder
  - c) Herstellung reaktiver Gruppen auf der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen und/oder
  - d) Verbindung eines oder mehrerer Verbindungs moleküle mit der Oberfläche der Iad-Nanoteilchen durch kovalente oder nicht-kovalente Bindung.
30. Verfahren zur Herstellung der einfachen Nachweissonde nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Verteilungsbreite der Ausdehnungen der in Schritt a) hergestellten Iad-Nanoteilchen auf einen Bereich von +/-20 % einer mittleren Ausdehnung eingeschränkt ist.  
25
31. Verfahren zur Herstellung der erweiterten Nachweissonde gemäß den Ansprüchen 21 bis 28 enthaltend die Schritte  
30

- e) Bereitstellung der einfachen Nachweissonde
- f) Modifikation der Oberfläche eines Affinitätsmoleküls, um reaktive Gruppen einzuführen, die eine Konjugation mit der einfachen Nachweissonde erlauben
- 5 g) Konjugation des aktivierte Affinitätsmoleküls und der einfachen Nachweissonde.

32. Verfahren zum Nachweis einer biologischen oder sonstigen organischen Substanz enthaltend die Schritte

- 10 h) Zusammenführen der erweiterten Nachweissonde gemäß einem der Ansprüche 21 bis 28 und des biologischen und/oder organischen Materials,
- i) Abtrennung von erweiterten Nachweissenden, die keine Bindung eingegangen sind,
- 15 j) Belichtung der Probe mit einer elektromagnetischen Strahlung oder mit einem Teilchenstrahl
- k) Messung des Fluoreszenzlichtes oder Messung der Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung der Strahlung oder der Änderung derselben.

20

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem zu untersuchenden biologischen Material um Serum, Zellen, Gewebeschnitte, Rückenmarksflüssigkeit, Sputum, Plasma, Urin oder um eine andere Probe humanen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs handelt.

25

34. Verfahren nach Anspruch 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, dass der zu untersuchende Analyt in dem zu untersuchenden biologischen oder sonstigen Material immobilisiert ist.

30

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass das zu untersuchende biologische und/oder organische Material gleichzeitig mit verschiedenen erweiterten Nachweissonden zusammengeführt wird und die verschiedenen erweiterten Nachweissonden sich dadurch voneinander unterscheiden, dass ihre Affinitätsmoleküle an verschiedene Analyte anbinden und die in ihnen enthaltenen Lad-Nanoteilchen bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren, streuen, beugen oder Fluoreszenzlicht emittieren.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
15. November 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/86299 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/58, 33/543**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/04545**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. April 2001 (23.04.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
100 21 674.9 5. Mai 2000 (05.05.2000) DE  
101 06 643.0 12. Februar 2001 (12.02.2001) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **HOHEISEL, Werner** [DE/DE]; Gerslenkamp 19, 51061 Köln (DE). **PETRY, Christoph** [DE/DE]; Doerperhofstr. 16, 47800 Krefeld (DE). **HAASE, Markus** [DE/DE]; Klaus-Nanne-Str. 60, 22457 Hamburg (DE). **RIWOTZKI, Karsten** [DE/DE]; Schellingstr. 77, 22089 Hamburg (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: **23. Mai 2002**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

(54) Title: **DOPED NANOPARTICLES AS BIOLABELS**

**A3**

(54) Bezeichnung: **DOTIERTE NANOTEILCHEN ALS BIOLABEL**

**WO 01/86299**

(57) **Abstract:** The invention relates to a simple detection probe containing luminescent inorganic doped nanoparticles (i.i.d nanoparticles) which can be detected after excitation by a source of radiation by their absorption and/or scattering and/or diffraction of the excitation radiation or by emission of fluorescent light, and whose surface is prepared in such a way that affinity molecules for detecting a biological or other organic substance can couple with this prepared surface.

(57) **Zusammenfassung:** Gegenstand der Erfindung ist eine einfache Nachweissonde enthaltend lumineszierende anorganische dotierte Nanoteilchen (i.i.d Nanoteilchen), die nach Anregung mit einer Strahlungsquelle durch Absorption und/oder Streuung und/oder Beugung der Anregungsstrahlung oder durch Emission von Fluoreszenzlicht nachweisbar sind und deren Oberfläche so präpariert ist, dass Affinitätsmoleküle zum Nachweis einer biologischen oder sonstigen organischen Substanz an diese präparierte Oberfläche ankoppeln können.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/04545

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 GO1N33/58 GO1N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 GO1N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 893 999 A (ALBESSARD KEIKO ET AL) 13 April 1999 (1999-04-13) cited in the application abstract examples 9-20 --- ZIJLMANS H J M A A ET AL: "Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: A new reporter technology." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 267, no. 1, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 30-36, XP002185942 ISSN: 0003-2697 abstract table 1 page 32, line 3 - line 31 --- -/-	1,9-14, 16-23,32
X		1,9, 12-20

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2001

Date of mailing of the international search report

16/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuynman, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/04545

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 990 479 A (BRUCHEZ JR MARCEL ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23) cited in the application abstract column 7, line 5 -column 8, line 59 claims 1-50 ---	1-3, 7-11, 21-35
A	MEYSSAMY H ET AL: "WET-CHEMICAL SYNTHESIS OF DOPED COLLOIDAL NANOMATERIALS: PARTICLES AND FIBERS OF LAP04:EU, LAP04:CE, AND LAP04:CE,TB" ADVANCED MATERIALS, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, vol. 11, no. 10, 9 July 1999 (1999-07-09), pages 840-844, XP000865123 ISSN: 0935-9648 cited in the application the whole document ---	1,9-20
A	RIWOTZKI K ET AL: "Wet-chemical synthesis of doped colloidal nanoparticles: YV04:Ln (Ln = Eu, Sm, Dy)" J PHYS CHEM B; JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B DEC 10 1998 ACS, WASHINGTON, DC, USA, vol. 102, no. 50, 10 December 1998 (1998-12-10), pages 10129-10135, XP001034725 cited in the application the whole document ---	1,9-20
A	ZOBEL H -P ET AL: "Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides." ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, vol. 7, no. 5, October 1997 (1997-10), pages 483-493, XP001041977 ISSN: 1087-2906 abstract ---	1,5,6
A	US 5 593 783 A (MILLER JOHN B) 14 January 1997 (1997-01-14) column 7, line 66 -column 8, line 21 ---	1,4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/04545

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5893999	A 13-04-1999	JP 7083927	A	31-03-1995
US 5990479	A 23-11-1999	US 6207392	B1	27-03-2001
US 5593783	A 14-01-1997	NONE		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04545

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N33/58 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, COMPENDEX, INSPEC, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 893 999 A (ALBESSARD KEIKO ET AL) 13. April 1999 (1999-04-13) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Beispiele 9-20 --- ZIJLMANS H J M A A ET AL: "Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: A new reporter technology." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 267, Nr. 1, 1. Februar 1999 (1999-02-01), Seiten 30-36, XP002185942 ISSN: 0003-2697 Zusammenfassung Tabelle 1 Seite 32, Zeile 3 - Zeile 31 ---	1,9-14, 16-23,32
X	---	1,9, 12-20

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetüft)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der für zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. Dezember 2001

16/01/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tuynman, A

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04545

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	US 5 990 479 A (BRUCHEZ JR MARCEL ET AL) 23. November 1999 (1999-11-23) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Spalte 7, Zeile 5 -Spalte 8, Zeile 59 Ansprüche 1-50 ---	1-3, 7-11, 21-35
A	MEYSSAMY H ET AL: "WET-CHEMICAL SYNTHESIS OF DOPED COLLOIDAL NANOMATERIALS: PARTICLES AND FIBERS OF LAP04:EU, LAP04:CE, AND LAP04:CE,TB" ADVANCED MATERIALS, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, Bd. 11, Nr. 10, 9. Juli 1999 (1999-07-09), Seiten 840-844, XP000865123 ISSN: 0935-9648 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,9-20
A	RIWOTZKI K ET AL: "Wet-chemical synthesis of doped colloidal nanoparticles: YVO4:Ln (Ln = Eu, Sm, Dy)" J PHYS CHEM B; JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B DEC 10 1998 ACS, WASHINGTON, DC, USA, Bd. 102, Nr. 50, 10. Dezember 1998 (1998-12-10), Seiten 10129-10135, XP001034725 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,9-20
A	ZOBEL H -P ET AL: "Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides." ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, Bd. 7, Nr. 5, Oktober 1997 (1997-10), Seiten 483-493, XP001041977 ISSN: 1087-2906 Zusammenfassung ---	1,5,6
A	US 5 593 783 A (MILLER JOHN B) 14. Januar 1997 (1997-01-14) Spalte 7, Zeile 66 -Spalte 8, Zeile 21 ---	1,4

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/04545

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5893999	A	13-04-1999	JP	7083927 A		31-03-1995
US 5990479	A	23-11-1999	US	6207392 B1		27-03-2001
US 5593783	A	14-01-1997	KEINE			